

08.10.03

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 9月 9日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-263126
[ST. 10/C]: [JP2002-263126]

REC'D 27 NOV 2003

WIPO PCT

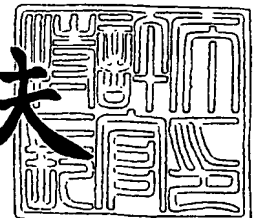
出 願 人
Applicant(s): 鐘淵化学工業株式会社
株式会社ジーシー

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年11月13日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 TKS-4865

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61F 2/30

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県明石市魚住町 2 5 6 8 - 3

【氏名】 丹羽 英夫

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市北区日の峰 1 丁目 1 0 番地の 8

【氏名】 福地 健

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市垂水区塩屋町 6 - 3 1 - 1 7 三青荘

【氏名】 清水 一朗

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県明石市大久保町谷八木 1 1 8 1 D - 2 0 2

【氏名】 大久保 聡子

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市垂水区塩屋町 6 - 3 1 - 1 7 三青荘

【氏名】 佐藤 匡生

【発明者】

【住所又は居所】 香川県高松市神在川窪町 3 3 2 - 3

【氏名】 山下 憲司

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県所沢市坂之下 9 8 4 - 2

【氏名】 金子 正

【特許出願人】

【識別番号】 000000941

【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000181217

【氏名又は名称】 株式会社ジーシー

【代理人】

【識別番号】 100086586

【弁理士】

【氏名又は名称】 安富 康男

【選任した代理人】

【識別番号】 100115141

【弁理士】

【氏名又は名称】 野田 慎二

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 033891

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0003934

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 組織再生用支持体およびその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 孔径 $10\ \mu\text{m}$ 以上 $500\ \mu\text{m}$ 以下、孔長 $50\ \mu\text{m}$ 以上 1cm 以下の縦長形状の孔が並列的に配置され、並置された各孔間は孔径 $10\ \mu\text{m}$ 以下の小孔で連通した構造を有する組織再生用の三次元多孔性支持体。

【請求項 2】 厚み方向に縦長な形状の孔が面方向に並列的に配置された概平板形状を有し、一方の面が開孔処理されているものである請求項 1 記載の三次元多孔性支持体。

【請求項 3】 生体適合性材料からなるものである請求項 1 または 2 記載の三次元多孔性支持体。

【請求項 4】 生体適合性材料がポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸／グリコール酸共重合体、ポリ ϵ カプロラクトン、乳酸／ ϵ カプロラクトン共重合体から選ばれる少なくとも 1 つを含んでなる請求項 3 記載の三次元多孔性支持体。

【請求項 5】 下記の工程からなる請求項 1 記載の三次元多孔性支持体の製造法：

- a) 支持体材料を有機溶媒に溶解し、
- b) 調製した溶液を型枠に流し込んだあと 5℃ /分以上の冷却速度で凍結し、
- c) 凍結した溶液を真空乾燥して、有機溶媒を除去する。

【請求項 6】 下記の工程からなる請求項 2 記載の三次元多孔性支持体の製造法：

- a) 支持体材料を有機溶媒に溶解し、
- b) 調製した溶液を、概平板形状になるような型枠に流し込んだ後、 5℃ /分以上の冷却速度で凍結し、
- c) 凍結した溶液を真空乾燥して有機溶媒を除去し、
- d) 乾燥後の支持体を厚み方向の中心部で平板方向に剥離する。

【請求項 7】 下記の工程からなる請求項 2 記載の三次元多孔性支持体の製造法：

- a) 支持体材料を有機溶媒に溶解し、

- b) 概平板形状になるような型枠に粒状塩を分散させ、
- c) 調製した溶液を前記型枠に流し込んだ後、5℃/分以上の冷却速度で凍結し、
- d) 凍結した溶液を真空乾燥して、有機溶媒を除去し、
- e) 粒状塩を水洗により除去する。

【請求項 8】 粒状塩が無機および／または有機の塩である請求項 7 記載の三次元多孔性支持体の製造法。

【請求項 9】 請求項 1 または 2 記載の三次元多孔性支持体に、組織由来の細胞あるいは前駆細胞を人工環境内および／または生体内において培養することにより得られる三次元細胞結合体。

【請求項 10】 組織由来の細胞あるいは前駆細胞が骨、軟骨、靱帯、腱、血管、皮膚、脂肪、筋肉、神経、心臓、肝臓、脾臓、腸、腎臓、角膜、膀胱、尿管、尿道、乳房、骨髓又は臍帯血由来のものである請求項 9 記載の三次元細胞結合体。

【請求項 11】 組織由来の細胞あるいは前駆細胞が骨、関節軟骨、靱帯又は腱由来のものである請求項 10 記載の三次元細胞結合体。

【請求項 12】 組織由来の細胞あるいは前駆細胞が骨髓、脂肪、肝臓又は臍帯血由来のものである請求項 10 記載の三次元細胞結合体。

【請求項 13】 組織由来の細胞あるいは前駆細胞が間葉系幹細胞である請求項 10 記載の三次元細胞結合体。

【請求項 14】 請求項 7 記載の方法で製造した三次元多孔性支持体に、組織由来の軟骨細胞あるいは前駆細胞を人工環境内および／または生体内において培養することにより得られる三次元細胞結合体であって、厚みの 1～20%相当の塩溶出処理部が生体軟骨の 1/10 未満の圧縮弾性率、残りの 80%～99%の部分が生体軟骨の 1/10 以上の圧縮弾性率を有する三次元細胞結合体。

【請求項 15】 請求項 7 記載の方法で製造した三次元多孔性支持体に、組織由来の軟骨細胞あるいは前駆細胞を人工環境内および／または生体内において培養することにより得られる三次元細胞結合体であって、塩溶出処理をしていない面側にその厚みが全体の厚みの 1%から 90%の範囲で正常軟骨により近い組織構

造を有する三次元細胞結合体。

【請求項 16】 請求項 1 または 2 記載の三次元多孔性支持体に、組織由来の細胞あるいは前駆細胞を播種し、人工環境内および／または生体内で培養することからなる三次元細胞結合体の製造法。

【請求項 17】 組織由来の細胞あるいは前駆細胞があらかじめ三次元環境下で 1 時間から 48 時間静置培養されたものである請求項 16 記載の三次元細胞結合体の製造法。

【請求項 18】 人工環境内の培養が、アスコルビン酸存在下で行われることからなる請求項 16 又は 17 記載の三次元細胞結合体の製造法。

【請求項 19】 人工環境内の培養が、培養液を支持体に対し毎秒 0.1 cm から毎秒 50 cm の速度で移動させる条件で行われることからなる請求項 16 ～ 18 のいずれか 1 項記載の三次元細胞結合体の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生体組織の再生に適した三次元多孔性支持体およびその製造法、さらに同支持体を用いた三次元細胞結合体およびその製造法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

現在、世界中で何千万人もの人々が事故による組織損傷や重傷の臓器不全の治療を受けているが、現行の臓器移植等、外科的治療や薬事治療は、臓器供給あるいは薬自体の効果の問題などで十分な治療ができていない状況である。そこでそのような患者に移植できる種々生体組織の再生に関わる研究がさかに行われている。特に軟骨については、スポーツ障害、変形性関節症など国内だけで数百万人の患者がいるとされ、この疾患の治療を目指した培養軟骨の製造を可能にする技術の開発が強く望まれている。なおここでいう培養軟骨とは、軟骨細胞で構成される三次元細胞結合体を指す。

培養軟骨の製造については、Minasら、Sittinger、Naughtonらの試験管、培養器内のような人工環境内での三次元担体構造体での作製例

(例えば、非特許文献1、特許文献1、特許文献2参照)、またVacantiらやNaughtonらの支持体／細胞混合物を用いたインビボ(in vivo)での軟骨形成の例(例えば、特許文献3、特許文献4、特許文献5参照)が報告されている。

【0003】

培養軟骨の製造においては、まず細胞を播種し、培養する足場として十分な機能、そしてある程度の機械的強度を有する支持体の確保が重要である。すなわち培養時に細胞を均一な分布状態で安定に保持・生着させ、さらに良好な増殖・生存性を確保できるものであり、加えて培養後、患部への移植時に縫合等固定処理が可能であり、かつ移植初期の(加重)圧縮に耐える機械的強度を併せ持った支持体を用いることが必要である。

そのアプローチとして種々の生分解性のプラスチックの利用が検討されており、Vacantiらは乳酸とグリコール酸の共重合体を塩溶出法で多孔質化した支持体を用いた培養軟骨作製を報告している(例えば、特許文献3参照)。また先述のNaughtonらは生分解性プラスチックのひとつであるポリグリコール酸でフェルト化した支持体に軟骨細胞を播種し、培養することによる培養軟骨作製を報告している(例えば、特許文献5参照)。しかしながら、これらの方法、特に塩溶出法による多孔性支持体では強度的にはある程度の性能を確保できるが、細胞の生着性に問題があり、生体に近い均一に細胞が分布した組織形成を確保した軟骨作製ができていないというのが現状である。ポリグリコール酸でフェルト化した支持体も細胞の生着性に課題を残しており、均一な組織形成不十分という点では同様の状況である。

【0004】

これらの解決方法のひとつとして、Chenらにより機械的強度を有する生分解性プラスチックPLGA(グリコール酸と乳酸とのコポリマー)と細胞生着性を有するコラーゲンを組み合わせた支持体を用いた軟骨作製例の報告がなされているが(例えば、非特許文献2参照)、狂牛病などコラーゲン自体の安全性が問われている最近の状況では極力コラーゲンをを用いない支持体の開発が望まれているのが実状である。

【0005】

【特許文献1】 国際公開第94/20151号パンフレット

【特許文献2】 国際公開第95/33821号パンフレット

【特許文献3】 米国特許第5041138号明細書

【特許文献4】 国際公開第90/1203号パンフレット

【特許文献5】 国際公開第97/30662号パンフレット

【非特許文献1】 Minasら、Articular Cartilage Defects, 1997年 20巻, 第6号, 525-538頁

【非特許文献2】 Chenら, J. Biomed. Mater. Res., 2000年, 51巻, 273-279頁

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

上述したように、従来開発された生分解性プラスチックを利用した多孔性支持体に関しては、細胞の生着性に問題があり、生体に近い均一に細胞が分布した組織形成を確保した軟骨作製ができていないというのが現状である。また、このような問題を解決するためにコラーゲンを利用した支持体による軟骨作製例の報告がなされているが、コラーゲンの安全性の観点より問題がある。

【0007】

加えて軟骨欠損部は、軟骨下骨より炎症性の細胞の侵入、それによる繊維化軟骨の形成の問題が指摘されており、開発を目指す培養軟骨は移植時に炎症性の細胞の浸潤を防ぐ性能を有することが望ましく、このためには、用いる三次元多孔性支持体について軟骨下骨接触面は培地などの通性を阻害することなく、炎症性の細胞の浸潤を阻む構造を有することが望ましい。

さらに三次元多孔性支持体は細胞播種の段階で効率的に細胞を導入させることが可能であり、かつ導入後は細胞が漏れにくいという特性を有することが望ましい。

【0008】

【課題を解決するための手段】

以上の問題解決を目的として我々は研究を行い、5℃/分の温度低下を可能にす

るような急速な凍結乾燥をキー技術とする作製方法により、これらを解決する支持体の作製およびその作製技術の開発に成功した。

すなわち、第1の本発明は、孔径 $10\mu\text{m}$ 以上 $500\mu\text{m}$ 以下、孔長 $50\mu\text{m}$ 以上 1cm 以下の縦長形状の孔が並列的に配置され、並置された各孔間は孔径 $10\mu\text{m}$ 以下の小孔で連通した構造を有する組織再生用の三次元多孔性支持体に関する。

【0009】

また第2の本発明は、a) 支持体材料を有機溶媒に溶解し、b) 調製した溶液を型枠に流し込んだあと $5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以上の冷却速度で凍結し、c) 凍結した溶液を真空乾燥して、有機溶媒を除去する工程からなる本発明の三次元多孔性支持体の製造法に関する。

【0010】

また第3の本発明は、上記三次元多孔性支持体に、組織由来の細胞あるいは前駆細胞を人工環境内および／または生体内において培養することにより得られる三次元細胞結合体に関する。

また第4の本発明は、本発明の三次元多孔性支持体に、組織由来の細胞あるいは前駆細胞を播種し、人工環境内および／または生体内で培養することからなる三次元細胞結合体の製造法に関する。

【0011】

本発明の支持体は、細胞の保持、生育性に優れ、この支持体を用いて、組織由来の細胞あるいは前駆細胞を人工環境内および／または生体内で培養することにより、生体移植時に炎症性の細胞の浸潤を防ぎ、周辺組織との適合性のある生体本来の組織に近い性質を有する三次元細胞結合体を作製することが可能となる。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明の組織再生用の三次元多孔性支持体は、孔径 $10\mu\text{m}$ 以上 $500\mu\text{m}$ 以下、孔長 $50\mu\text{m}$ 以上 1cm 以下の縦長形状の孔が並列的に配置され、並置された各孔間は孔径 $10\mu\text{m}$ 以下の小孔で連通した構造を有することを特徴とする。

【0013】

本発明の多孔性支持体は、例えば紡錘状などの縦長形状の孔が並列に並んだ構造を有する。上記孔の孔径は $10\mu\text{m}$ 以上 $500\mu\text{m}$ 以下であり、細胞を導入可能でかつ漏れにくい構造の確保の点から、好ましくは $20\mu\text{m}$ 以上 $150\mu\text{m}$ 以下である。上記孔の孔長は $50\mu\text{m}$ 以上 1cm 以下であるが、支持体内の培地拡散性保持の点から、好ましくは $50\mu\text{m}$ 以上 5mm 以下である。

【0014】

本発明の支持体では、並置された各孔間は孔径 $10\mu\text{m}$ 以下の小孔で連通した構造となっている。「孔径 $10\mu\text{m}$ 以下の小孔で連通した構造」とは、上記縦長形状の孔が、 50% 以上、好ましくは 70% 以上が孔径 $10\mu\text{m}$ 以下である小孔で互いに連結された構造を意味する。この小孔は、培地等の溶液は通すが、細胞は通さないものである。

【0015】

本発明の支持体において、有孔率は 70% 以上であることが好ましいが、細胞密度確保の点から $70\sim95\%$ のものがより好ましい。ここで有孔率とは、支持体における縦長形状の孔と小孔との合計の割合をいい、単位体積あたりの支持体材料の重量から算出したものである。また孔径及び孔長は、顕微鏡で評価、算出した。

【0016】

本発明でいうところの組織再生用とは、生体を構成する種々組織の再生用を意味する。

本発明の多孔性支持体の構造としては、不織布、フォーム、スポンジ、織物構造などが考えられ、作製可能であるが、機械的強度を考慮してフォームまたはスポンジ構造のものが望ましい。

本発明の多孔性支持体の形状については、三次元のものであれば特に限定されず、平板状のもの、もしくは球状などの球面構造を有するものが使用可能であるが、支持体内の培地拡散を十分かつ均等に確保するなどの点から平板状が好ましい。なお支持体を平板状にまず作製した後、これを厚みを有する円筒状（チューブ状）などの形状に変形させたものを用いることもできる。

【0017】

本発明の多孔性支持体につき、以下平板形状を例に説明する。

この支持体では両方の面に $10\text{ }\mu\text{m}$ 程度の孔が空いている形状のもので、培地通性は十分確保した上で細胞が通過しにくい構造を有している。これは支持体の中に導入された細胞が漏れ出ること防ぐとともに、外部、特に軟骨下骨からの炎症性細胞の浸潤を防ぐために有効な構造である。また各孔間の横方向の連通性については、培地の移動は可能であるが、細胞の移動はできない孔径 $10\text{ }\mu\text{m}$ 以下のサイズの孔で連通しており、細胞の生育性に良好な環境を与え、播種された細胞が横面から漏出すること防ぐ構造を有している。

【0018】

本発明のより好ましい態様として、厚み方向に縦長な形状の孔が面方向に並列的に配置された概平板形状を有し、一方の面が開孔処理されている三次元多孔性支持体を挙げることができる。

ここで、「厚み方向」とは縦長孔の縦長方向を意味し、「縦長な形状の孔が面方向に並列的に配置」とは縦長孔を同じ方向に並置することを意味する。また、「概平板形状」とは完全な平板形状はもちろんのこと、平板形状に近い形状であるものを全て含むものである。

【0019】

「開孔処理」とは孔径を拡大させることを意味し、例えば以下のような塩溶出法による開孔処理、剥離法による開孔処理などが挙げられる。

塩溶出法とは、支持体を作製する時に、片面の表層部についてのみリーチング法と呼ばれる塩溶出処理操作を組み合わせた方法である。これにより、片面を孔拡大することができ、さらにロート状の形状をとることにより孔への細胞導入を効率的に行うことができる。

剥離法とは、凍結乾燥法で作製した支持体が、例えば紡錘状の縦長形状の孔の厚み方向の中央付近に広面と並行に空隙あるいは結晶境界を形成することを活用し、支持体を中心部あたりで縦に割く形で、つまり平板方向に剥離して作製する方法である。これにより、一方の面（剥離面）に 50 から $150\text{ }\mu\text{m}$ 平均の細胞が容易に通過できる孔径を確保できる。

【0020】

本発明の多孔性支持体の材質は特に限定されないが、生理学的条件下で体内に吸収される物質、つまり生体適合性材料が好ましく、これは天然のものでも合成物質でもよい。

【0021】

多孔性支持体を構成する生体適合性材料としては、天然物から得られるものと合成により得られるものが挙げられるが、加工性、滅菌性、感染性の点から、加水分解により分解し得る合成ポリマーが好ましく、特に α および β -ヒドロキシカルボン酸の加水分解性ポリマーが好ましい。このような生体適合性材料の例としては、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸／グリコール酸共重合体、ポリ ϵ -カプロラクトン、乳酸／ ϵ -カプロラクトン共重合体などが挙げられる。

本発明で使用される乳酸とグリコール酸とのコポリマー（PLGA）などコポリマーとしては、グリコール酸と乳酸との重量比が、99：1ないし1：99であるコポリマー、特に75：25ないし25：75の比のコポリマーが好ましい。また他の共重合体についても、乳酸以外のモノマーと乳酸との重量比は、上述したグリコール酸と乳酸との重量比と同じ範囲にあることが好ましい。

【0022】

本発明の支持体は、厚さを適宜設定し、患部を補填するために必要なサイズにすることができる。本発明の支持体の厚さは、好ましくは50 μ mから1cmである。なおヒトの膝あるいは股関節の治療に用いる場合には、1ないし3mmの厚さのものが実際上好ましい。

また上記支持体の形状および面積については特に限定はなく、患部を補填するために十分なサイズのものを作製することができる。例えば、ヒトの膝あるいは股関節の治療に用いる場合には、好ましくは10ないし20mmの直径の円筒形のものである。

【0023】

次に三次元多孔性支持体の製造法について説明する。

本発明の三次元多孔性支持体の製造法は、下記の工程からなることを特徴とする：

a) 支持体材料を有機溶媒に溶解し、

- b) 調製した溶液を型枠に流し込んだあと 5℃/分以上の冷却速度で凍結し、
- c) 凍結した溶液を真空乾燥して、有機溶媒を除去する。

凍結乾燥処理に先立ってこれら支持体材料を溶液状にするにあたり、溶媒としては通常種々の有機溶媒を用いることができるが、好ましくはクロロホルム、ジオキサン、ポリエチレングリコールである。

【0024】

また溶解させた支持体材料の溶液を流し込む型枠について、その材質は特に限定されるものではないが、凍結乾燥処理に耐える材質である金属、ガラス製が好ましい。

また上記型枠の形状は特に限定されず、例えば軟骨損傷治療の場合には、軟骨の構造に類似する概平板形状を用いるなど、再生を目指す各組織の形状の構築を基本とするものであれば、各疾患の治療上有効な形状については、すべて使用することができる。

【0025】

凍結による固化は、少なくとも 5℃/分の温度低下、つまり 5℃/分以上の冷却速度となるように急速に凍結することが必要となる。例えば、超低温フリーザーや液体窒素を用いることにより、この温度低下（冷却速度）が可能となる。

この後、凍結した溶液を真空乾燥して、有機溶媒を除去することにより、三次元多孔性支持体を得ることができる。

【0026】

本発明の好ましい態様である、厚み方向に縦長な形状の孔が面方向に並列的に配置された概平板形状を有する三次元多孔性支持体は、剥離法を用いた下記の工程から製造することができる：

- a) 支持体材料を有機溶媒に溶解し、
- b) 調製した溶液を、概平板形状になるような型枠に流し込んだ後、5℃/分以上の冷却速度で凍結し、
- c) 凍結した溶液を真空乾燥して、有機溶媒を除去し、
- d) 乾燥後の支持体を厚み方向の中心部で平板方向に剥離する。

本明細書において、「厚み方向の中心部で平板方向に剥離する」とは、支持体の

厚み方向の中央付近で、平板の上下方向に剥離することを意味する。

【0027】

上記概平板形状を有する三次元多孔性支持体は、塩溶出法を用いた下記の工程から製造することもできる：

- a) 支持体材料を有機溶媒に溶解し、
- b) 概平板形状になるような型枠に粒状塩を分散させ、
- c) 調製した溶液を上記型枠に流し込んだ後、5℃/分以上の冷却速度で凍結し、
- d) 凍結した溶液を真空乾燥して、有機溶媒を除去し、
- e) 粒状塩を水洗により除去する。

ここで、粒状塩とは粒子径500μm以下の結晶性物質を意味し、KCl、NaCl、CaCl₂のような無機塩、各種アンモニウム塩、クエン酸三ナトリウムのような有機化合物の塩などが挙げられる。粒子径の点からクエン酸三ナトリウムが特に好ましい。

塩溶出法を用いた本発明の方法で三次元多孔性支持体を作製した場合、厚みの1～20%で塩溶出処理部による孔が形成され、残りの80%～99%で上記縦長形状の孔が形成された構造となる。

【0028】

本発明の三次元細胞結合体は、本発明の三次元多孔性支持体に、組織由来の細胞あるいは前駆細胞を人工環境内および／または生体内において培養することにより得られる。

つまり、本発明でいうところの三次元細胞結合体とは、組織由来の細胞又は前駆細胞を本発明の支持体に播種して、これを人工環境内および／または生体内で培養することで作製された生体の各器官、組織の類似体をいう。

【0029】

本発明で用いる組織由来の細胞又は前駆細胞としては、例えば、骨、軟骨、靱帯、腱、血管、皮膚、脂肪、筋肉、神経、心臓、肝臓、脾臓、腸、腎臓、角膜、膀胱、尿管、尿道、乳房など生体の各器官若しくは組織由来の細胞又は前駆細胞；骨髓、臍帯血由来の間葉系幹細胞などの幹細胞などを用いることができる。

このうち、組織構造の単純性の観点から、骨、関節軟骨、靱帯、腱由来のもの、また、採取の容易さと、種々の分化への高い分化能を有するという観点から、骨髓、脂肪、肝臓、臍帯血由来のものが好ましく用いられ、間葉系幹細胞であるものがより好ましく用いられる。

また、組織再生のために用いることから、当該三次元細胞結合体は上記生体本来の各器官や組織に近い性質を有することが好ましい。「組織に近い性質」とは、組織染色で算出した細胞数より求めた組織形成度が生体の70%以上となることを意味する。

【0030】

本発明の三次元細胞結合体としては、塩溶出法を用いる本発明の方法で作製した三次元多孔性支持体に、組織由来の軟骨細胞あるいは前駆細胞を人工環境内および／または生体内において培養することにより得られ、厚みの1～20%相当の塩溶出処理部、すなわち開孔処理された構造部分が生体軟骨の1/10未満の圧縮弾性率、残りの80%～99%の部分が生体軟骨の1/10以上の圧縮弾性率を有する三次元細胞結合体も挙げられる。

塩溶出法を用いる本発明の方法で作製した支持体は、良好な細胞播種性の附与のみならず、良好な組織形成を可能にする。ゆえに塩溶出法を用いる本発明の方法で三次元細胞結合体を作製すれば、上記圧縮弾性率で示されるように、厚みの1～20%にあたる開孔処理された構造部分（塩溶出処理部）が、残りの80～99%の構造部分（非塩溶出処理部）に比べ、明らかに柔らかい性質の組織として作製できる。

【0031】

本発明における力学強度測定条件では、その圧縮弾性率は塩溶出された部分が $2.5 \times 10^{-3} \text{ MPa} \sim 1.5 \times 10^{-1} \text{ MPa}$ の圧縮弾性率であり、その他の部分の $1.5 \times 10^{-1} \text{ MPa} \sim 2.0 \text{ MPa}$ に比べ、明らかに柔らかい構造であるといえる。このような性質は、本三次元細胞結合体を実際に患部に埋め込んだ際、反対側の軟骨組織を痛めることを回避する点で極めて有効な構造であるといえる。なお圧縮弾性率とは、圧縮時に受ける応力の歪みに対する変化率である。

。

【0032】

本発明の別の三次元細胞結合体としては、塩溶出法を用いる本発明の方法で製造した三次元多孔性支持体に、組織由来の軟骨細胞あるいは前駆細胞を人工環境内および／または生体内において培養することにより得られる三次元細胞結合体であって、開孔処理をしていない面側にその厚みが全体の厚みの1%から90%の範囲で正常軟骨により近い組織構造を有する三次元細胞結合体も挙げられる。

ここで「全体の厚み」とは、開孔処理をしていない面側より開孔処理をした面側までの幅方向の長さのことを意味する。また、「正常軟骨により近い組織構造」とは、組織染色で算出した細胞数より求められた組織形成度が正常軟骨の70%以上となり、正常軟骨に匹敵する機械的強度を有する構造を意味する。

【0033】

次に、本発明の三次元細胞結合体の製造法について説明する。

上記製造法は、本発明の三次元多孔性支持体に、組織由来の細胞あるいは前駆細胞を播種し、人工環境内および／または生体内で培養することを特徴とする。

上記製造法において、組織由来の細胞あるいは前駆細胞の播種は公知の方法で行うことができるが、支持体1cm³あたり10⁶～10⁸の密度となるように細胞又は前駆細胞を播種することが好ましい。

上記方法において、「人工環境内で培養」とは、試験管、培養器など生体外で培養することを意味する。

上記方法において、「生体内で培養」とは、例えば、支持体を生体組織内に設置して細胞を培養するような、生体組織内での培養を意味する。

上記方法において、組織由来の細胞あるいは前駆細胞は、あらかじめ三次元環境下で1時間から48時間静置培養されたものであることが、細胞の支持体への固定の観点から好ましい。

ここで「三次元環境下で培養する」とは、細胞の固まりを形成させた状態で培養を行うことを意味する。上記培養をマイクロマス培養というが、本培養の具体的な方法としては、例えば96穴の平板プレートに10⁵～10⁷個の細胞を入れ培養する方法などが挙げられる。

【0034】

本発明の支持体に組織由来の細胞又は前駆細胞を播種し培養するにあたり、細胞の創製を促進するために種々の添加因子を共存させることができる。例えば、bFGF（塩基性繊維芽細胞増殖因子）、BMP（骨形成因子）、TGF- β （変換増殖因子 β ）、IGF（インスリン様増殖因子）、PDGF（血小板由来増殖因子）などの高分子蛋白性因子、そしてヒアルロン酸、コンドロイチンなどムコ多糖、さらにアスコルビン酸、トコフェロール、コエンザイムQ10など各種ビタミン類である。

本発明の実施例で示すように、アスコルビン酸の存在下での培養が細胞増殖および組織創製に極めて有効であることから、上記添加因子としてはアスコルビン酸が特に好ましい。

上記添加因子の添加量は添加因子の種類によって異なるが、培地中での終濃度が0.001～1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう添加することが好ましい。

【0035】

また本発明の三次元細胞結合体の製造法において、人工環境内の培養は、培養液を支持体に対し毎秒0.1 cmから毎秒50 cmの速度で移動させる条件で行われることが、三次元細胞結合体への新鮮な培地の供給の観点、また三次元細胞結合体からの老廃物の除去の観点より好ましい。

【0036】

さらに本発明の実施例の軟骨創製では、関節より採取した細胞を平板培養で増幅し、マイクロマス培養を行った後に支持体への播種を行っている。これは平板培養で低下した軟骨機能を回復させる目的で実施されたもので、実際、軟骨細胞の機能マーカーであるプロテオグリカン、コラーゲンタイプ2のmRNA発現および同蛋白質生産の回復を確認している。

【0037】

以上の方法で作製された結合体は、例えば本発明の実施例で作製した軟骨組織を例に挙げると、アルシアンブルー色素を用いた組織染色評価の結果、非開孔処理面側にアルシアンブルーに強く染まる部分が偏在しており、この面側に正常様の軟骨形成が進んでおり、逆に開孔処理面側にアルシアンブルー染色性の弱い部分が偏在しており、この面側では組織形成が進んでいない箇所が遍在することが示

された。このような組織形成の偏りは、本培養軟骨組織を用いた治療において移植片の周囲部組織（骨、軟骨）との整合性を確保する上で有利な構造であると考ええる。

【0038】

【実施例】

以下に実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

（実施例1）PLGA支持体の作製方法

a. 塩溶出法によるPLGA支持体の作製方法

生体適合性材料である乳酸／グリコール酸共重合体（75：25）をジオキサンに溶解し、4wt. %に調整した。ガラス板で作製した型枠に粒状塩としてクエン酸三ナトリウムを約 0.05 g/cm^2 になるよう分散させ、調整した溶液を2mmの厚さになるまで流し込み、ガラス板で蓋をした。次に -40°C にフリーザーで急速に凍結して（ $5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の冷却速度）、凍結後、 -0.1 MPa で48時間真空乾燥し、ジオキサンを除去した。乾燥後、型枠から剥離し、流水にて粒状塩を洗い流し、十分に乾燥させることにより、支持体を得た。

得られた支持体の厚さ方向から見た断面、塩溶出処理した側（即ち開孔処理を行った側から見た面）、開孔処理を行っていない側から見た面の電子顕微鏡写真を図1に示す。開孔処理した側の孔は、開孔処理していない側の孔の大きさに比べて大きくなっていることが確認された。また、塩溶出法で作製した支持体の塩溶出処理部の厚みは全体の15%であった。

b. 剥離法によるPLGA支持体の作製方法

生体適合性材料である乳酸／グリコール酸共重合体（75：25）をジオキサンに溶解し、4wt. %に調整した。ガラス板で作製した型枠に調整した溶液を2mmの厚さになるまで流し込み、ガラス板で蓋をした。次に -40°C にフリーザーで急速に凍結して（ $5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の冷却速度）、凍結後、 -0.1 MPa で48時間真空乾燥し、ジオキサンを除去した。乾燥後、型枠から剥離し、十分に乾燥させた後に、厚み方向の中心部で平板方向に剥離することにより支持体を得た。

【0039】

(実施例 2) PLGA 支持体を用いた培養軟骨の作製

生後約 1 年の日本ザーネン種ヤギ膝関節より軟骨組織を採取し、コラゲナーゼにより軟骨細胞を分離した。この細胞を 10% ウシ胎児血清及び終濃度 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアスコルビン酸を含有する Ham' s F-12 培地を用いて培養し、2 回継代した軟骨細胞を 96 穴組織培養プレートへ 1 穴当り 1×10^6 個加えて一晩 (約 16 時間) マイクロマス培養を行った後、培養軟骨の作製に供した。

【0040】

25 キログレイ (KGr y) で γ 線滅菌した実施例 1-a の塩溶出法で作製した PLGA 支持体を前記培地中に置き、減圧下で脱気して支持体表面に培地をなじませた後、マイクロマス培養を行った軟骨細胞を支持体 1 cm^3 当り 1×10^7 の密度となるように播種した。軟骨細胞を播種した支持体を培養シャーレに置き、同培地を支持体が隠れる程度に加え、1 晩静置培養した。この後、20 ml の同培地がはいった直径 10 cm の培養シャーレに支持体を移し、水平円運動を行える振盪機を用いて 30 rpm の回転数で旋回培養を行った。旋回培養開始後 14 日目に支持体を取り出し、作製された培養軟骨を組織学的及び生化学的 (ELISA) に評価した。この PLGA 支持体を用いて作製された培養軟骨の組織像は、図 2 に示されたように顕著なアルシアンブルー陽性を呈した。さらに、これらの組織中に存在する軟骨細胞は繊維芽細胞様の形態ではなく、永久軟骨細胞と非常に似かよった形態を有していた (図 2)。この培養軟骨を 4 M グアニジン塩酸溶液で可溶化し、ELISA により軟骨に特徴的なコラーゲンである II 型コラーゲン及び軟骨型のプロテオグリカンであるアグレカンの検出を試みたところ、アグレカン及び II 型コラーゲンの存在が認められた (図 3、図 4)。また、この PLGA 支持体は、片側が孔拡大され、もう一方の側が細胞の通過を妨げる細孔構造を有しているという構造上の特徴を持つ。作製された培養軟骨は、非開孔 (非孔拡大) 処理側ではアルシアンブルー強陽性を示し、細胞の形態も永久軟骨に極めて近く、開孔 (孔拡大) 処理側ではアルシアンブルーの染色性はやや弱いまま残っているという組織形成の極性が見られた (図 5)。

また実施例 1-b の剥離法で作製した PLGA 支持体を用いた実験も同様に実施し、1-a の塩溶出法によるものと同等の結果であることが確認された。

【0041】

(実施例3) 本発明方法で作製したPLGA支持体の細胞保持能比較

実施例1-aの塩溶出法で作製したPLGA支持体(支持体Aとする)に軟骨細胞を播種してその細胞保持能を検討した。軟骨細胞の調製及び支持体への播種は実施例2に記載された方法により行った。支持体Aを直径10mm、厚さ1mmのディスク状(容積 78.5mm^3)に整形し、これらに $5 \times 10^7/\text{ml}$ の細胞濃度に調製した軟骨細胞懸濁液 $30\mu\text{l}$ を各支持体に播種した。これを培養シャーレ状で1時間静置した後、支持体から漏出した培地中の細胞数を計測した(表1)。支持体Aは、表1に示されたように、漏出した培地中に検出された細胞の数は播種した細胞数の0.033%であった。これは比較例1で示した従来法(塩溶出法)で作製したPLGA支持体(支持体B)の細胞保持能と比べて極めて高いものである。

また実施例1-bの剥離法で作製したPLGA支持体を用いた実験も同様に実施し、実施例1-aの塩溶出法によるものと同等の結果であることが確認された。

【0042】

(比較例1) 従来法の塩溶出法で作製したPLGA支持体の細胞保持能

従来法の塩溶出法で作製したPLGA支持体(支持体Bとする)に軟骨細胞を播種して、その細胞保持能を検討した。この方法によるPLGA支持体は、Mikosらの方法(Biomaterial 1993年 14巻 323-330頁)に従い作製され、支持体全体に塩粒子に起因する孔が形成されたものとなっている。軟骨細胞の調製、支持体への播種及び漏出した細胞の計測は実施例2及び3に記載された方法により行い、結果を表1に示した。この結果から、塩溶出法で作製した支持体では播種した細胞懸濁液中の細胞がかなり漏出していることが分かる。

【0043】

【表 1】

細胞保持能の比較

	支持体 A	支持体 B
播種した細胞懸濁液の容量	30 μ l	30 μ l
播種した細胞数 (a)	1.5×10^6	1.5×10^6
漏出した培地の量	10 μ l	10 μ l
漏出した培地中の細胞数 (b)	~ 500	$\sim 2.5 \times 10^5$
漏出細胞率 (b/a $\times 100$)	0.033%	16.7%

【0044】

(実施例 4) 本発明方法で作製した PLGA 支持体を用い作製した培養軟骨の組織形成度 (組織染色)

実施例 1-a の塩溶出法で作製した PLGA 支持体 (支持体 A) に軟骨細胞を播種して、その組織形成度を比較した。軟骨細胞の調製、支持体への播種及び播種した細胞の培養は実施例 2 に記載された方法により行った。支持体 A を旋回培養開始後 30 日目に取り出し、組織学的評価に供した。再生軟骨組織切片のヘマトキシリン・エオシン染色像及びアルシアンブルー染色像を図 6 に示した。図 6 からわかるように本発明の PLGA 支持体を用いて作製した培養軟骨は、正常軟骨とほぼ同等の細胞密度を有し、アルシアンブルー染色性も陽性を呈した。

また実施例 1-b の剥離法で作製した PLGA 支持体を用いた実験も同様に実施し、実施例 1-a の塩溶出法によるものと同様の結果であることが確認された。

【0045】

(比較例 2) 従来法 (塩溶出法) で作製した PLGA 支持体を用い作製した培養軟骨の組織形成度 (組織染色)

比較例 1 の支持体 B を用いた以外は、実施例 4 と同様に行った。結果を図 6 に示した。図 6 からわかるように従来法 (塩溶出法) による PLGA 支持体を用いて作製した培養軟骨の組織形成度は、本発明方法による PLGA 支持体を用いて作製した培養軟骨に比べて極めて乏しいものであった。

【0046】

(実施例 5) アスコルビン酸が培養軟骨の生成に及ぼす効果

以下のような方法でアスコルビン酸が培養軟骨の生成に及ぼす効果について検討した。実施例 2 に記載された方法により、軟骨細胞を調製し、実施例 1-a の塩溶出法で作製した PLGA 支持体に播種した。この支持体を終濃度 $50 \mu\text{g}/\text{m l}$ のアスコルビン酸を含む Ham' s F-12 培地と含まない培地で 2 週間培養し、軟骨組織の形成度をアルシアンブルーの染色性により検討した。図 7 からわかるようにアスコルビン酸を培地に添加することにより軟骨組織の形成が顕著に改善された。

また実施例 1-b の剥離法で作製した PLGA 支持体を用いた実験も同様に実施し、実施例 1-a の塩溶出法によるものと同等の結果であることが確認された。

【0047】

(実施例 6) マイクロマス培養が培養軟骨の生成に及ぼす効果

以下のような方法でマイクロマス培養が培養軟骨の生成に及ぼす効果について検討した。実施例 2 に記載された方法により、軟骨細胞を調製し、96 穴培養プレートの 1 穴当り 1×10^6 個の細胞を加え、CO₂ インキュベーター内に 16 時間静置し、マイクロマス培養を行った。この細胞を実施例 2 に記載された方法により実施例 1 で作製した支持体に播種し、2 週間旋回培養を行った。このようにして作製した培養軟骨と、マイクロマス培養を行わないで作製した組織とのアルシアンブルー染色性を比較した (図 8)。図 8 からわかるようにマイクロマス培養を行って作製した培養軟骨のアルシアンブルー染色性は、行わないものに比べて良好であった。

【0048】

(実施例 7) 培養軟骨の力学強度測定

実施例 1-a の塩溶出法で作製した PLGA 支持体を用い、実施例 2 に記載された方法で作製し、さらに直径 6.5 mm、厚み 1.5 mm に整形した培養軟骨モジュールを、PBS 溶液中 25℃ にて 30 分間平衡化後、ヘッドスピード 0.1 mm/秒で圧縮を加えた時に受ける応力を以下の方法で測定した。

すなわち、応力値 $2.5 \times 10^{-4} \text{ MPa}$ を呈する歪みを ϵ_0 (サンプル表面)、応力値 $1.5 \times 10^{-2} \text{ MPa}$ を呈する歪みを ϵ_{15} とし、その間を開孔処理

された部分と認識した。また、圧縮弾性率は開孔処理された部分を除く部分（内部構造）で求めることとし、歪みが ϵ 15 から 0.10 増加する間の圧縮応力の変化率にて算出した（図 9）。

なお、圧縮には、ASTM: D1621-94 に準拠した上記の「テクスチャーアナライザー TA-XT2i（Stable Micro Systems 社製）」付属の制御解析ソフト Texture Expert Exceed のマニュアルに従って行った。図 9 中、「支持体」とは実施例 1 の PLGA 支持体のみを PBS で平衡化したもの、「培養軟骨」とは本発明の三次元細胞結合体、「生体軟骨」とはヤギ大腿骨軟骨であり、各サンプルの平均値および標準偏差をプロットしている。

また実施例 1-b の剥離法で作製した PLGA 支持体を用いた実験も同様に実施し、実施例 1-a の塩溶出法によるものと同等の結果であることが確認された。

【0049】

【発明の効果】

本発明により、細胞播種性、細胞保持性、及び、細胞の組織形成度に優れた生体適合性の三次元多孔性支持体の作製が可能となり、軟骨を始め種々の生体様組織の創製において優れた材料を提供することができる。

また、上記支持体から作製される本発明の細胞結合体は、優れた組織形成度及び治療効果を示す。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、本発明の支持体の厚さ方向から見た断面、開孔処理を行った側から見た面、開孔処理を行っていない側から見た面の電子顕微鏡写真図である。

【図 2】 図 2 は、培養軟骨組織染色（アルシアンブルー染色）を示した図である。

【図 3】 図 3 は、培養軟骨プロテオグリカンの ELISA 定量の結果を示した図である。

【図 4】 図 4 は、培養軟骨 II 型コラーゲンの ELISA 定量の結果を示した図である。

【図 5】 図 5 は、培養軟骨組織染色（アルシアンブルー染色）の結果を示した図である。

【図 6】 図 6 は、本発明の支持体と従来の塩溶出法支持体との培養軟骨組織染色性を比較した結果を示した培養軟骨組織染色図である。

【図 7】 図 7 は、本発明の細胞結合体に対する培養軟骨創製へのアスコルビン酸添加効果を示した図である。

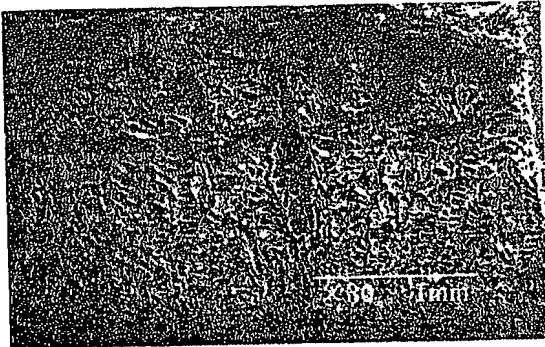
【図 8】 図 8 は、本発明の細胞結合体に対する培養軟骨創製へのマイクロマス培養処理の効果を示した図である。

【図 9】 図 9 は、実施例 7 に示した培養軟骨の力学強度測定の結果を表すグラフである。

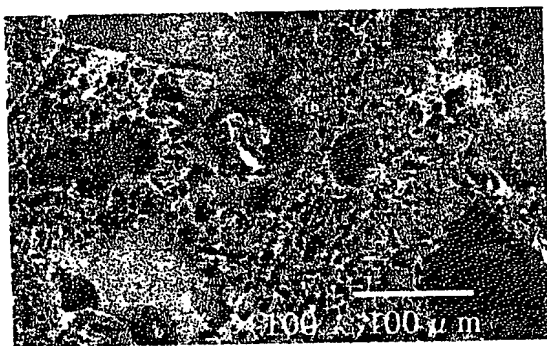
【書類名】

図面

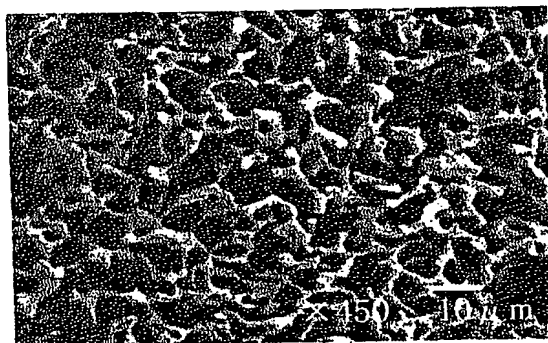
【図 1】



断面



開孔側



非開孔側

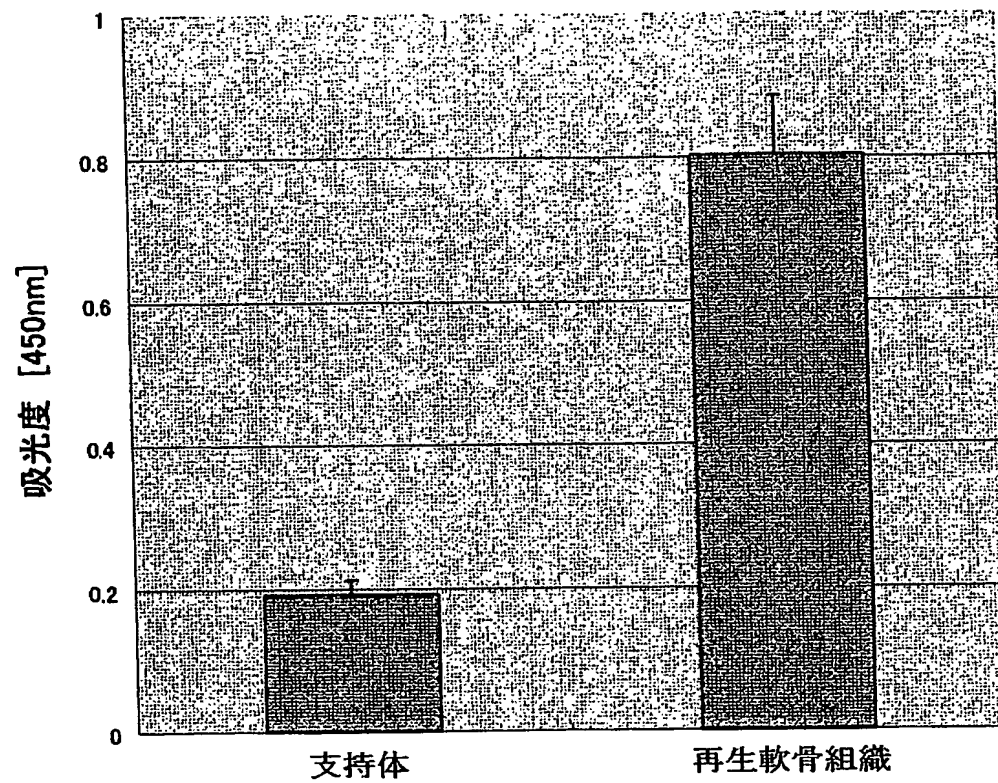
【図 2】

培養軟骨組織のアルシアンブルー染色像



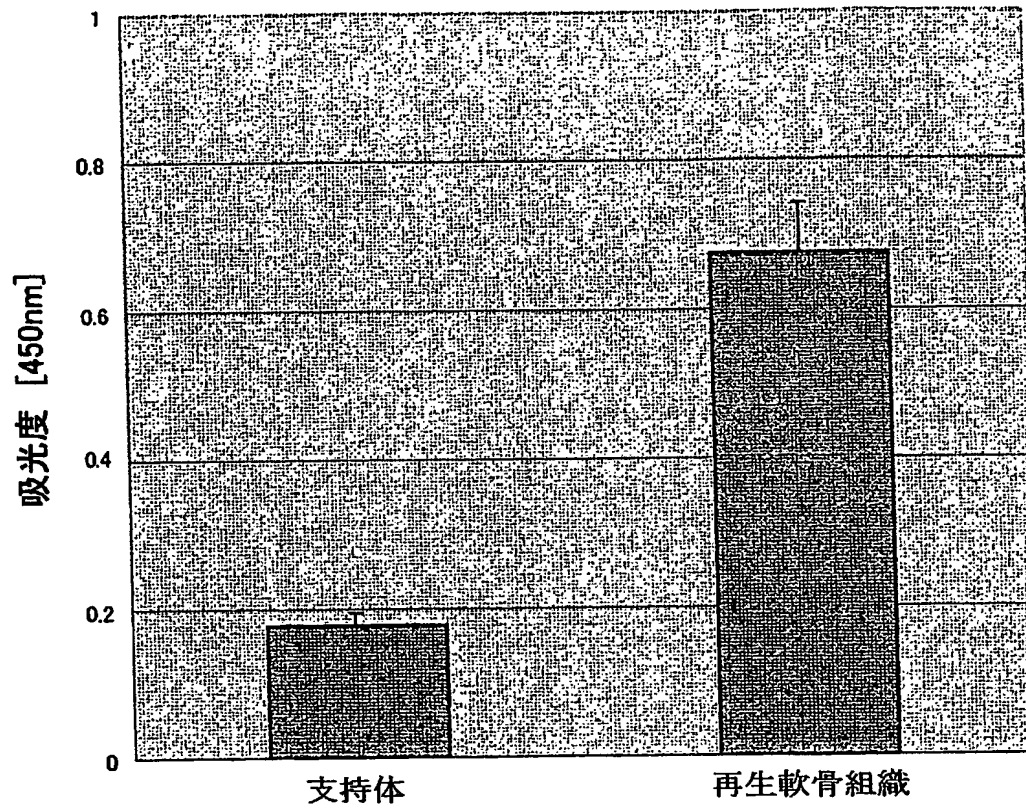
【図3】

ELISAによるアグレカン産生の検出



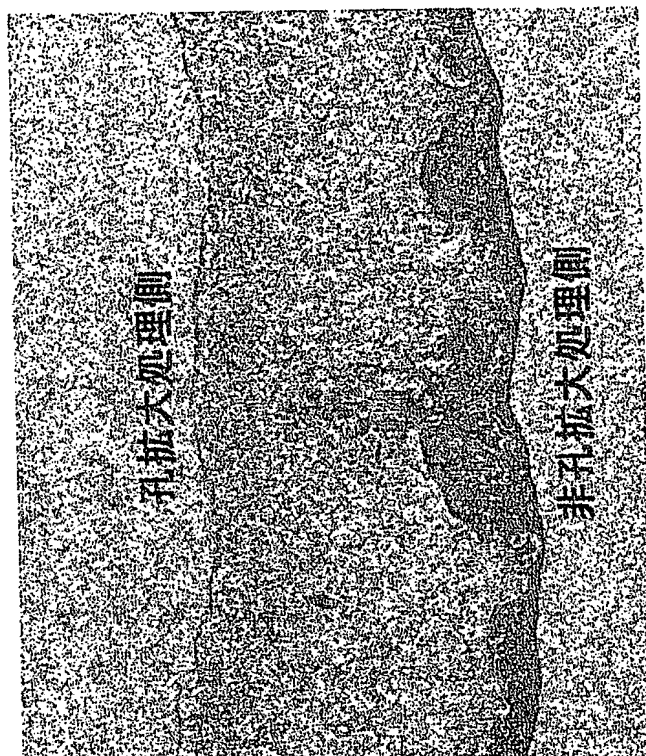
【図 4】

ELISAによるⅡ型コラーゲン産生の検出



【図 5】

PLGA支持体の構造上の極性とその効果

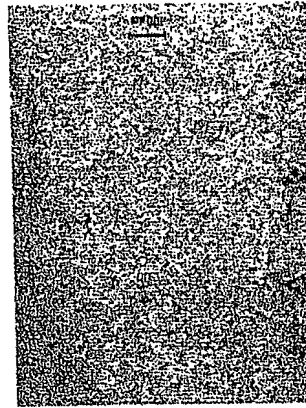
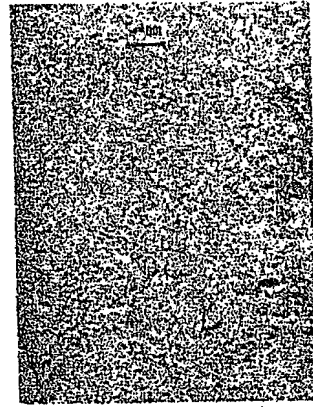
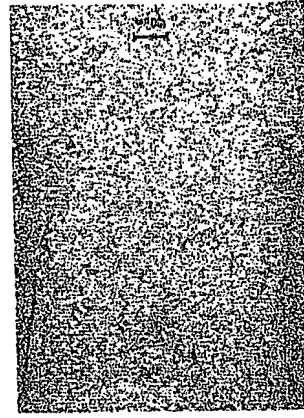
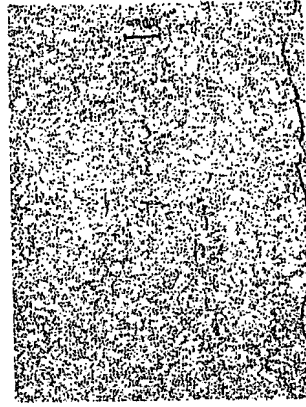


【図 6】

培養軟骨組織の組織染色像

支持体B

支持体A



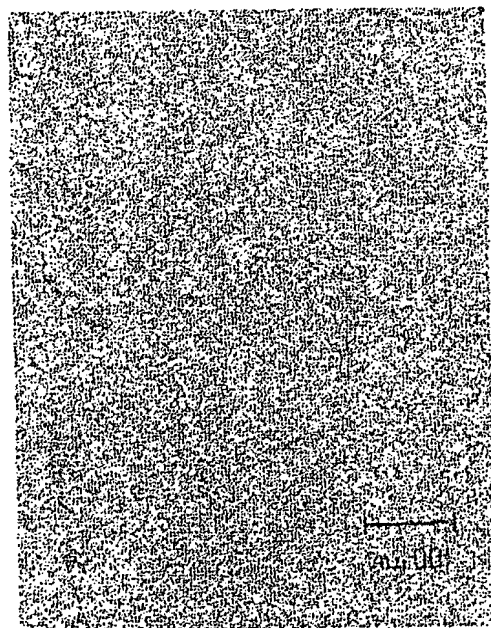
ヘマトキシリン・エオシン染色

アルシアンブルー染色

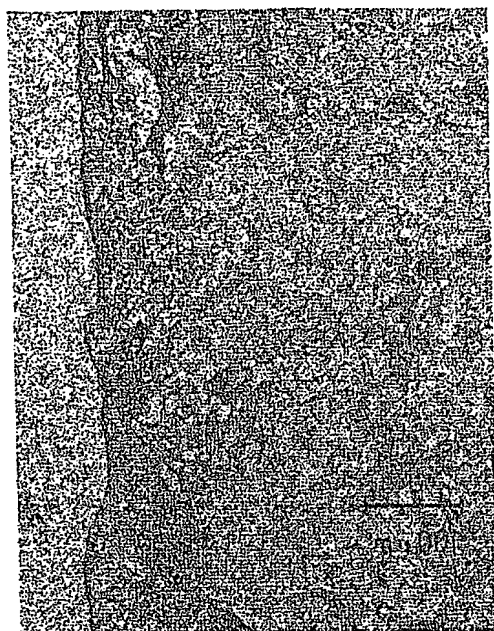
軟骨組織再生に及ぼすアスコルビン酸の効果

【図 7】

アスコルビン酸 (ー)



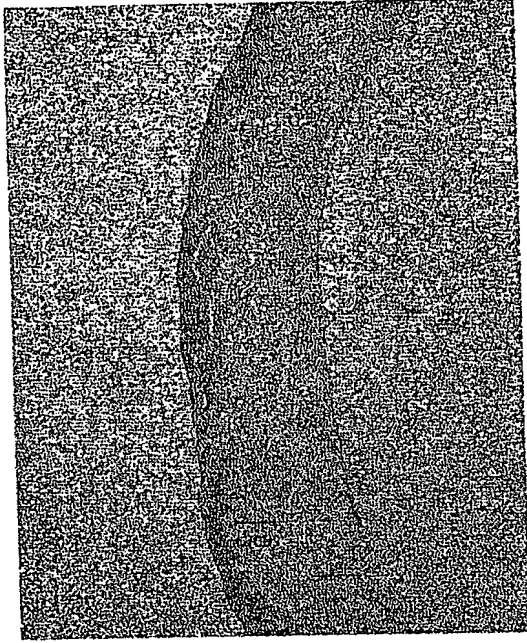
アスコルビン酸 [50 μ g/ml]



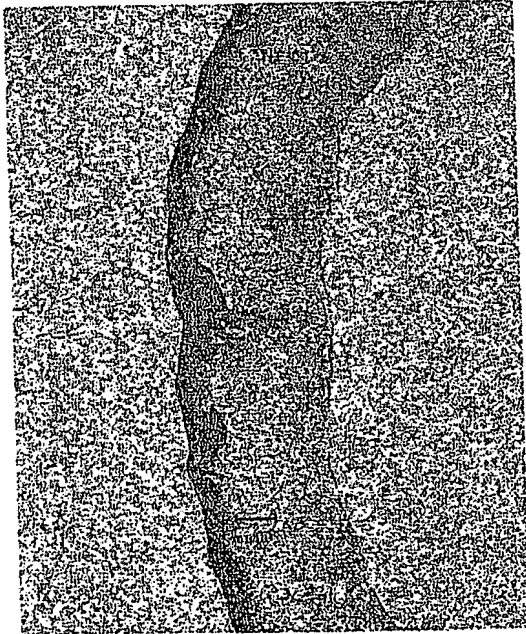
マイクロマス培養の効果

【図 8】

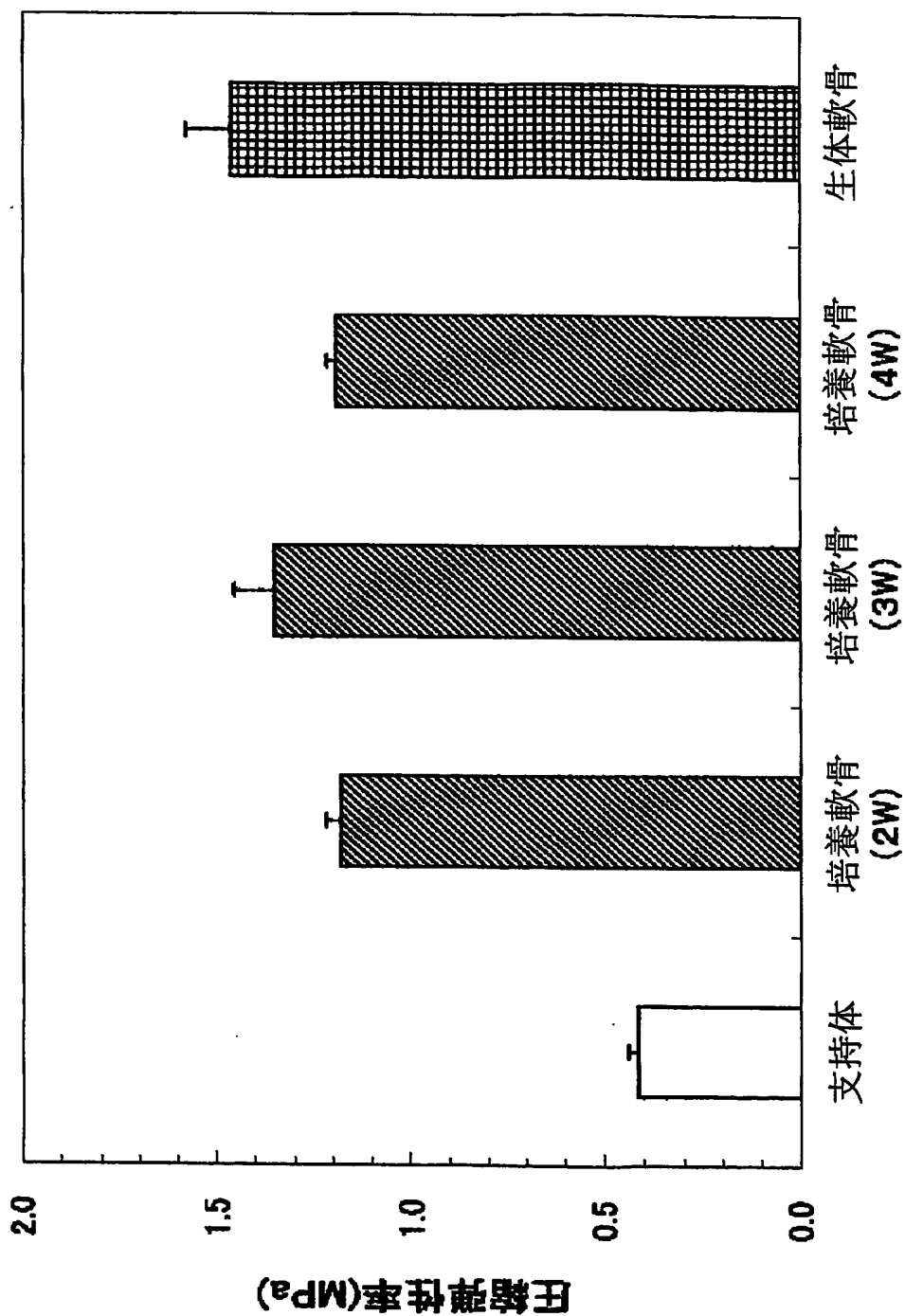
マイクロマス培養を行っていないもの



マイクロマス培養を行ったもの



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 培養時に細胞を均一な分布状態で安定に保持・生着させ、さらに良好な増殖・生存性を確保できるものであり、特に軟骨の場合には、加えて培養後、患部への移植時に縫合等固定処理が可能であり、かつ移植初期の（加重）圧縮に耐える機械的強度を併せ持った支持体の開発。

【解決手段】 急速な凍結乾燥をキー技術とする作製方法により、孔径 $10\ \mu\text{m}$ 以上 $500\ \mu\text{m}$ 以下、孔長 $50\ \mu\text{m}$ 以上 $1\ \text{cm}$ 以下の縦長形状の孔が並列的に配置された構造を有する組織再生用の三次元多孔性支持体を提供する。また剥離操作、あるいは表層部の塩溶出処理操作を組み合わせた片面の孔拡大処理により、細胞の播種性を高めた同三次元多孔性支持体を提供する。この支持体に組織由来の細胞あるいは前駆細胞を播種し、人工環境内及び/又は生体内で培養することにより優れた治療効果を有する三次元細胞結合体の作製が可能となる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-263126
受付番号	50201348016
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 9月10日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 9月 9日
-------	-------------

次頁無

特願 2 0 0 2 - 2 6 3 1 2 6

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 0 9 4 1]

1 . 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区中之島 3 丁目 2 番 4 号

氏 名

鐘淵化学工業株式会社

特願 2002-263126

出願人履歴情報

識別番号

[000181217]

1. 変更年月日

1990年 8月23日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都板橋区蓮沼町76番1号

氏 名

而至歯科工業株式会社

2. 変更年月日

1991年 6月12日

[変更理由]

名称変更

住 所

東京都板橋区蓮沼町76番1号

氏 名

株式会社ジーシー

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.